

## DETECTING METHOD OF FOOD-POISONING BACTERIA AND SENSOR USING THE SAME

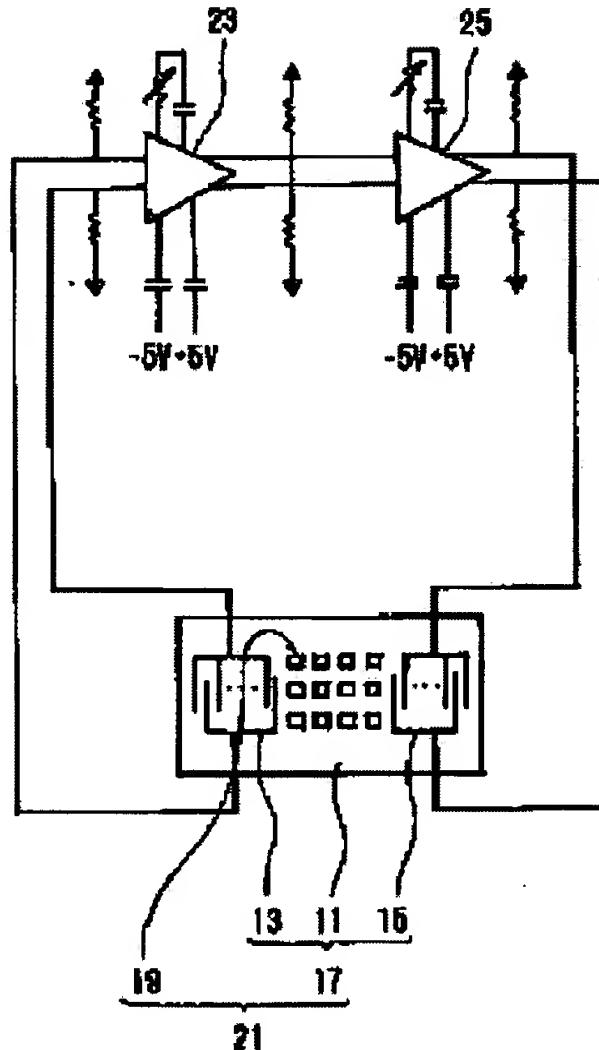
**Patent number:** JP5034349  
**Publication date:** 1993-02-09  
**Inventor:** KOYANO TAKESHI; SAITO MINORU; MIYAMOTO HIROO; UMIBE KATSUAKI; KATO MASAKAZU  
**Applicant:** OKI ELECTRIC IND CO LTD  
**Classification:**  
 - International: G01N5/02; G01N33/543; G01N33/569  
 - european:  
**Application number:** JP19910189105 19910730  
**Priority number(s):** JP19910189105 19910730

[Report a data error here](#)

### Abstract of JP5034349

**PURPOSE:** To detect a food-poisoning bacteria in a food constituent simply and quickly by bringing the food constituent into contact with a surface acoustic wave element on which an anti-food-poisoning bacteria antibody is stuck and by measuring a change in a frequency before and after the contact.

**CONSTITUTION:** A surface acoustic wave oscillator 17 having transducers 13 and 15 provided on a crystal plate 11 of ST cut is covered with polystyrene and an anti-food-poisoning-bacteria antibody 19 is stuck between the two transducers 13 and 15, whereby a sensor 21 is prepared. This sensor 21 is connected with amplifiers 23 and 25 and a frequency counter provided between them. A food constituent is brought into contact with the sensor 21, and based on a change in a frequency before and after the contact, a food-poisoning bacteria in the food constituent is detected. The sensor 21 is subjected to washing in three times by a phosphoric acid buffer and protection of a nonspecific adsorption site by calf serum albumin, so as to prevent fluctuation in the frequency due to a cause other than combination of the food-poisoning bacteria.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/569	B 9015-2 J			
5/02	A 7172-2 J			
33/543	Q 7906-2 J			

## 審査請求 未請求 請求項の数3(全6頁)

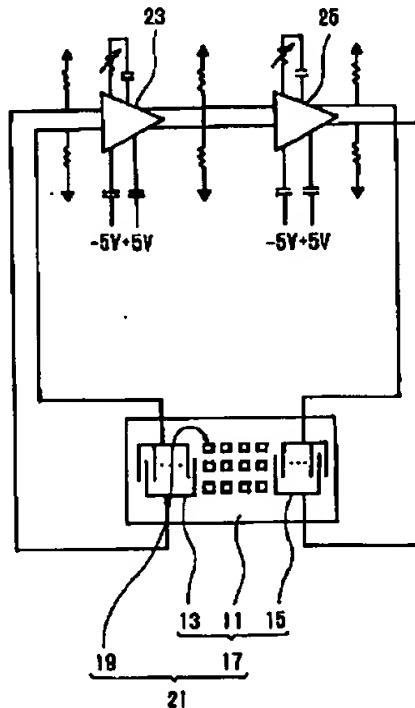
(21)出願番号	特願平3-189105	(71)出願人	000000295 沖電気工業株式会社 東京都港区虎ノ門1丁目7番12号
(22)出願日	平成3年(1991)7月30日	(72)発明者	小谷野 武 東京都港区虎ノ門1丁目7番12号 沖電気 工業株式会社内
		(72)発明者	斎藤 稔 東京都港区虎ノ門1丁目7番12号 沖電気 工業株式会社内
		(72)発明者	宮本 裕生 東京都港区虎ノ門1丁目7番12号 沖電気 工業株式会社内
		(74)代理人	弁理士 大垣 孝
			最終頁に続く

## (54)【発明の名称】 食中毒性細菌の検出方法及びこれに用いるセンサ

## (57)【要約】

【目的】 食物中の食中毒性細菌を簡便にかつ迅速に検出できる方法を提供すること。

【構成】 S Tカット水晶板11を用いた表面弹性波発振器17をポリスチレンで被覆する。この表面弹性波発振器17の第一及び第二のトランステューサー13, 15間に部分上に抗食中毒性細菌抗体19を付着させセンサ21とする。このセンサを食物成分と接触させ接触前後の周波数変化に基づき食中毒性細菌を検出する。



11: S Tカットの水晶板  
13: 第一のトランステューサ  
15: 第二のトランステューサ  
19: 抗食中毒性細菌抗体  
21: 実施例のセンサ  
23, 25: 増幅器

実施例のセンサ及び測定系の説明に供する図

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 食中毒性細菌の有無を検出するに当り、表面弹性波素子に抗食中毒性細菌抗体を付着させ、該抗体付着済みの表面弹性波素子に食物成分を接触させ、該接触の前後での前記表面弹性波素子の周波数変化から前記食物成分中の食中毒性細菌を検出することを特徴とする食中毒性細菌の検出方法。

【請求項2】 請求項1に記載の食中毒性細菌の検出方法において、

前記表面弹性波素子をポリスチレンによって被覆し、該ポリスチレン被覆済みの表面弹性波素子に前記抗食中毒性細菌抗体を付着させることを特徴とする食中毒性細菌の検出方法。

【請求項3】 表面弹性波素子をポリスチレンによって被覆し該ポリスチレンに抗食中毒性細菌抗体を付着させて成ることを特徴とする食中毒性細菌検出用センサ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、食中毒性細菌の検出方法及びこれに用いて好適なセンサに関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 食中毒には、細菌性食中毒と化学性食中毒とがある。細菌性食中毒はさらに感染型（例えば腸炎ビブリオ症、サルモネラ症など）と毒素型（例えばブドウ球菌の産生毒による中毒、ポツリヌス症など）とに分類される。汚染食物中に毒素がすでに多量に産生されている毒素型の細菌性食中毒は、発病に要する時間が短いという性質をもっている。

【0003】 細菌性食中毒は、感染型、毒素型にかかわらず、特に生活環境が悪く衛生観念が低い地域で多くの犠牲者を出している。このような地域では、食物が細菌で汚染される機会が極めて高く、さらに、慢性的な食料不足から細菌で汚染された食物や腐敗している食物を口にすることが日常茶飯事であるためである。

【0004】 細菌性食中毒の発生を防止するには、食物中に食中毒の原因となる食中毒性細菌が存在するか否かを簡便かつ迅速に検出することが有効である。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、現在のところ食中毒性細菌を簡便かつ迅速に検出できる好適な方法は、この出願に係る発明者の知る限りなかった。

【0006】 この発明はこのような点に鑑みなされたものであり、したがってこの発明の目的は食中毒性細菌を簡便かつ迅速に検出できる方法とこれに用いて好適なセンサとを提供することにある。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 この目的の達成を図るために、この出願に係る発明者は種々の検討を重ねた。その

結果、表面弹性波発振器、表面弹性波フィルタ等の表面弹性波素子の発振周波数、共振周波数がこの表面弹性波素子に付着する物質量に比例して減少することに着目した。そして、この技術にさらに抗原-抗体反応を導入することにより上記目的の達成が可能であることを見出しこの発明を完成するに至った。

【0008】 したがって、この出願の第一発明によれば、食中毒性細菌の有無を検出するに当り、表面弹性波素子に抗食中毒性細菌抗体を付着させ、該抗体付着済みの表面弹性波素子に食物成分を接触させ、該接触の前後での前記表面弹性波素子の周波数変化から前記食物成分中の食中毒性細菌を検出することを特徴とする。

【0009】 ここで、表面弹性波素子に抗食中毒性細菌抗体を付着させの付着とは、当該抗体付着済みの表面弹性波素子を食物成分に接触させた際に当該抗体が表面弹性波素子から離脱することができない程度のものであることを前提として、形態は問わない。物理的に付着する場合化学的に付着する場合のいずれであっても良いと考える。後述の実施例では、当該抗体を含有する液体に表面弹性波素子を数時間接触させることにより当該抗体を表面弹性波素子に吸着させている。

【0010】 また、抗食中毒性細菌抗体付着済みの表面弹性波素子に食物成分を接触させの接触とは、表面弹性波素子に付着させた抗食中毒性細菌抗体に食物成分（具体的には食物成分中の細菌）を有効に接触させることができれば手段は問わない。後述の実施例では、抗食中毒性細菌抗体付着済みの表面弹性波素子を、細菌培養液に数分間接触させることにより行っている。

【0011】 また、食物成分とは、抗原としての食中毒性細菌を抗食中毒性細菌抗体と反応し易い状態としてあるものを意味する。具体的には、例えば食物を食中毒性細菌の培養液やバッファに溶解させた溶液などを挙げることができる。

【0012】 なお、この第一発明の実施に当たり、前述の表面弹性波素子をポリスチレンによって被覆しその後に該ポリスチレン被覆済みの表面弹性波素子に抗食中毒性細菌抗体を付着させるのが好適である。ポリスチレンはタンパク質が付着し易いため、抗食中毒性細菌抗体の表面弹性波素子への付着を容易とするからである。

【0013】 また、この出願の第二発明の食中毒性細菌検出用センサは、表面弹性波素子をポリスチレンによって被覆し該ポリスチレンに抗食中毒性細菌抗体を付着させて成ることを特徴とする。

## 【0014】

【作用】 この出願の第一発明の食中毒性細菌の検出方法によれば、抗食中毒性細菌抗体付着済みの表面弹性波素子に食物成分を付着させた際に、該食物成分中に食中毒性細菌が含まれている場合はこの細菌が表面弹性波素子の抗体に特異的に結合し表面弹性波素子の発振周波数または共振周波数が低下する。食物成分中に食中毒性細菌

が含まれていない場合は上記周波数低下は起こらない。このような周波数変化の違いを利用して食物成分中の食中毒性細菌の有無の検出ができる。

【0015】また、この出願の第二発明の食中毒性細菌の検出用センサ（以下、単に「センサ」と称することもある。）によれば第一発明の実施を容易にする。

【0016】

【実施例】以下、図面を参照してこの出願の食中毒性細菌の検出方法及びこれに用いるセンサの実施例について併せて説明する。ここで、図1は実施例のセンサの構成及び測定系の説明に供する図、図2は実施例のセンサの作製方法の説明に供する図、図3及び図4は実施例のセンサの特性説明に供する図である。

【0017】1. 抗体の作製

抗食中毒性細菌抗体をこの実施例では次のような免役法により作製した。なお、この免役法については、文献（「バイオテクノロジー実験マニュアル」（1987）、三共出版）に詳しい。

【0018】抗体の作製に用いた抗原は、この実施例の場合、感染型食中毒性細菌抗原の一種であるサルモネラ抗原（フナコシ薬品社製。型番49-0634-02）及び毒素性食中毒性細菌抗原の一種であるブドウ球菌抗原（フナコシ薬品社製。型番49-0636-41）である。

【0019】抗原（例えばサルモネラ抗原）5mgと仔牛血清アルブミン（sigma社製）1.7mgとをpH7.3のリン酸バッファ1mlに溶解させる。なお、このリン酸バッファは、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>を0.29%、NaClを0.08%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を0.02%及びKC1を0.02%含むものとしている。なお、含有率の表示は重量%である（以下、この実施例において同じ。）。

【0020】次に、抗原及び仔牛血清アルブミンを溶解させた上記リン酸バッファに20%のグルタールアルデヒド水溶液を10μl添加し抗原とグルタールアルデヒドとを24時間反応させる。グルタールアルデヒドは関東化学社製を用いた。

【0021】次に、このリン酸バッファーから未反応のグルタールアルデヒドを除くためにリン酸バッファにより4℃の温度で一晩透析する。さらに、pH8.0のトリス緩衝液（0.3% - Tris-mabase, 0.05% - HC1）により4℃の温度で一晩透析する。このようにして、接種用抗原を得た。

【0022】得られた接種用抗原をマウスに接種する。このマウスからサルモネラ菌抗体を得た。

【0023】抗原をブドウ球菌抗原として上述の手順と同様な手順でマウスからブドウ球菌抗体を得た。

【0024】2. 実施例のセンサの作製

表面弹性波素子として、この実施例では、図1に示すように、STカットの水晶板11上に第一のトランステュ

ーサ13と第二のトランステューサ15とを具えた公知の表面弹性波発振器17であって発振周波数が10.3MHzのものを用意した。なお、この場合の表面弹性波発振器17は、大きさが1インチ×0.5インチ（1インチは約2.54cm。以下、同様。）で厚さが0.04インチのものである。

【0025】次に、ポリスチレンを溶解させたアセトン中に、上述の表面弹性波発振器17を浸漬する。次に、この表面弹性波発振器17をポリスチレンのアセトン溶液から引き出した後放置することにより溶媒であるアセトンを揮発させる。これにより、表面弹性波発振器17表面はポリスチレン（図示せず）により被覆される。なお、ポリスチレンの被覆量は、表面弹性波発振器17を覆うことができかつ表面弹性波発振器17の特性を極端に悪化させることがない程度の量とする。ポリスチレンの被覆量は、ポリスチレンのアセトン溶液でのポリスチレン濃度や、この溶液から表面弹性波発振器17を引き上げる速度等により調整可能である。

【0026】次に、ポリスチレンで被覆した表面弹性波発振器17を図2に示す装置の台座31の凹部31aにセットする。

【0027】ここで、図2は、表面弹性波発振器17に抗食中毒性細菌抗体を付着させるため及び抗食中毒性細菌抗体を付着させた表面弹性波発振器17に食物成分を接触させるために、この実施例で用意した装置の断面図である。図2において、31は上述の台座、31aは上述の凹部、33はO（オ）リング、35は台座31に重ねて使用する上側ブロック、35aは上側ブロックに設けられた試料液ため用の開口部である。台座の所定位にはボルト37を通すための穴部31bが設けてある。上側ブロック35の、前記穴部31bと対向する部分にはボルト37のための雌ねじ部39を形成してある。

【0028】表面弹性波発振器17を台座31の凹部31aにセットした後Oリング33を介し上側ブロック35を台座31に重ね上側ブロック35及び台座31をボルトにより固定する。このようにすると、表面弹性波発振器17の、第一のトランステューサ13と第二のトランステューサ15との間の部分が、Oリング33の内側に位置しつつ上側ブロック35の開口部35aと対向するようになる（図2の状態）。

【0029】次に、表面弹性波発振器17がセットされている状態の図2に示した装置の上側ブロック35の試料液ため用開口部35aに、上述の如く作製したサルモネラ菌抗体とブドウ球菌抗体とを例えば等モルづつ溶解させたリン酸バッファを、入れる。抗体を溶解させたりン酸バッファは、Oリング33及び開口部35aで規定される空間に溜るので、表面弹性波発振器17の、両トランステューサ13, 15間の部分と接触する状態になる。そして、この状態の装置全体を4℃の温度に設定し

た冷蔵庫に一晩入れ、インキュベートを行なう。この処理において、表面弹性波発振器17の、両トランスデューサ13、15間の部分に抗食中毒性細菌抗体を付着させることができる。

【0030】次に、表面弹性波発振器17をセットしてある装置のボルト37をゆるめて台座31と上側プロック35とを離し抗体を溶解させたリン酸バッファをこの装置から流し出し除去する。その後、装置の試料液だめ用の開口部35a及び表面弹性波発振器17をリン酸バッファにより3回洗浄する。表面弹性波発振器17に不安定に付着している抗食中毒性細菌抗体を除去するためである。

【0031】次に、表面弹性波発振器17をセットしてある装置のボルト37を再び締めて台座31と上側プロック35とをOリングを介し再び重ねる。そして、試料液だめ用の開口部35aに、今度は、1%仔牛血清アルブミン-リン酸バッファ溶液を入れこの状態で室温で2時間放置する。表面弹性波発振器17の抗食中毒性細菌抗体が吸着しなかった領域（非特異吸着サイト）を仔牛血清アルブミンで保護するためである。

【0032】このようにして、ポリスチレンを被覆表面弹性波発振器17に抗食中毒性細菌抗体19を付着させて成る実施例のセンサ21が得られる（図1参照）。勿論、図1は、模式図であることは理解されたい。

【0033】なお、上述のリン酸バッファによる3回の洗浄及び仔牛血清アルブミンによる非特異吸着サイトの保護を行なっているので、実施例のセンサで食中毒性細菌の結合以外の原因で周波数変動が生じるのを極力防止できる。

### 【0034】3. 実施例のセンサの特性

次に、実施例のセンサのサルモネラ菌に対する発振周波数変化及びブドウ球菌に対する発振周波数変化をそれぞれ以下のように測定した。

【0035】先ず、実施例のセンサ21を図1に示すように増幅器23、25と接続する。増幅器23、25間に周波数カウンタ（図示せず）を接続し実施例のセンサの発振周波数を測定する。なお、この測定系は公知のものである。

【0036】次に、実施例のセンサ21を先ずサルモネラ菌の濃度を所定濃度としたバッファ液中に浸漬し浸漬後10分経過後の発振周波数を測定し、この発振周波数からセンサをバッファに浸漬する前の発振周波数を減じることにより周波数変化量を求めた。バッファ中にセンサを浸漬後10分経過後に発振周波数を測定したのは、このような経過時間であると周波数が充分に安定したからである。

【0037】サルモネラ菌の濃度を種々に変えた場合のセンサの発振周波数変化を上記手順と同様な手順でそれぞれ求めた。

【0038】図3は、センサを浸漬するバッファ中のサ

ルモネラ菌濃度（単位：mg/m1）を横軸にとり、センサの発振周波数変化（KHz）を縦軸にとって、両者の関係をプロットした特性図である。

【0039】また、センサのブドウ球菌濃度に対する周波数変化の特性についてもサルモネラ菌の場合同様に求める。図4にこの特性を示した。

【0040】図3及び図4から明らかのように、センサの発振周波数は、細菌濃度の増加に伴い特定の関係で減少することが分かる。このことから、この発明の方法によれば、食中毒性細菌の検出が可能なことが分かる。

【0041】上述においてはサルモネラ菌、ブドウ球菌を対象として実施例の説明を行なっていたがこの出願に係る各発明は他の食中毒性細菌の検出にも利用することができる。

【0042】また、上述の実施例では表面弹性波素子をSTカット水晶板を用いた表面弹性波発振器で構成していたが、他の材料で構成したものでも勿論良い。また、表面弹性波フィルタに抗食中毒性細菌抗体を吸着させた場合も実施例と同様な効果が期待できる。

【0043】また、上述の実施例では、抗食中毒性細菌抗体を表面弹性波発振器17の、第一及び第二トランスデューサ13、15間部分に付着させていたが、抗食中毒性細菌抗体を付着させる領域はこれに限らず設計に応じ変更できる。

### 【0044】

【発明の効果】上述した説明からも明らかのように、この出願の第一発明の食中毒性細菌の検出方法によれば、食中毒性細菌を簡便かつ迅速に検出することができる。

【0045】また、この出願の第二発明の花粉センサによれば、これを食物成分を溶解させたバッファに浸漬し周波数変化を測定するのみで食物成分中の食中毒性細菌の有無を検出できるので、第一発明の食中毒性細菌の検出方法を容易に実施することができる。

### 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例のセンサ及び測定系の説明に供する図である。

【図2】実施例のセンサの作製方法の説明に供する図である。

【図3】実施例のセンサでの、サルモネラ菌に対する発振周波数変化の特性を示した図である。

【図4】実施例のセンサでの、ブドウ球菌に対する発振周波数変化の特性を示した図である。

### 【符号の説明】

11：STカットの水晶板

13：第一のトランスデューサ

15：第二のトランスデューサ

17：表面弹性波発振器

19：抗食中毒性細菌抗体

21：実施例のセンサ

23, 25：増幅器

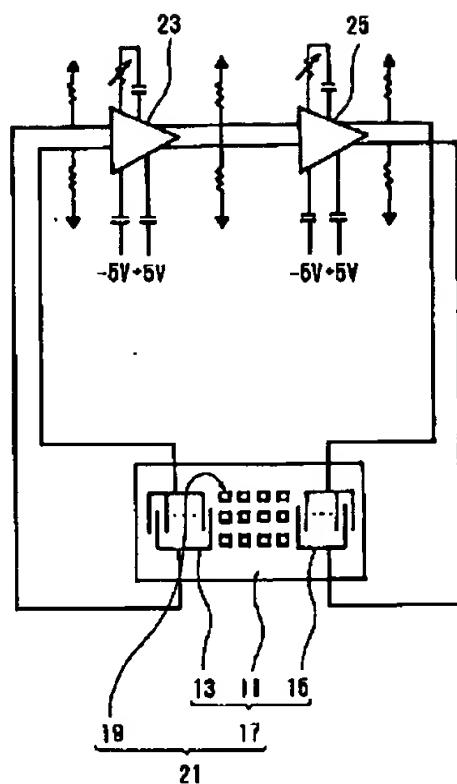
7

8

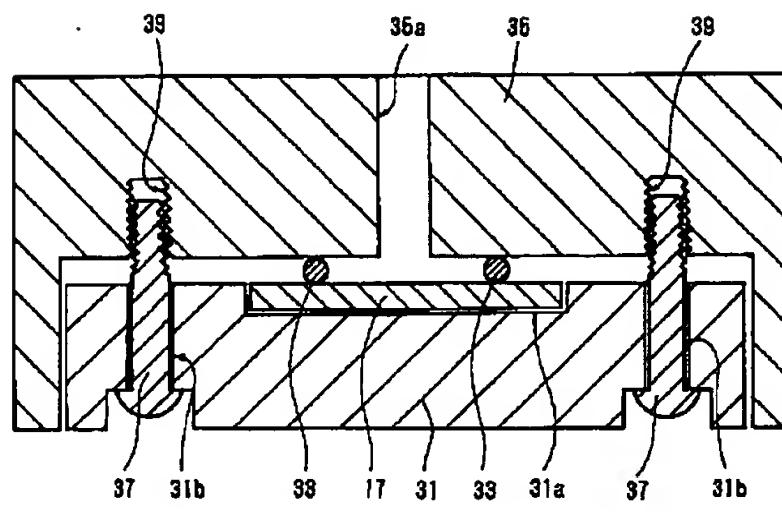
31: 台座  
31a: 凹部  
33: ○(オー) リング  
35: 上側ブロック

35a: 試料液だめ用開口部  
37: ボルト  
39: 雌ねじ部

【図1】



【図2】



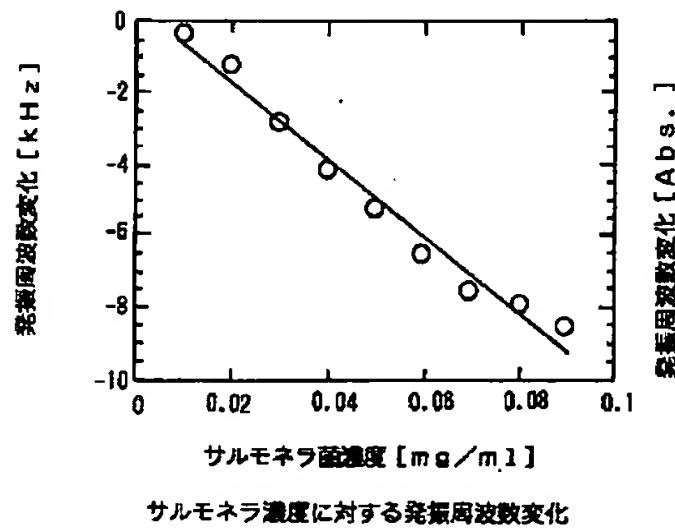
31: 台座  
31a: 凹部  
31b: 欠部  
33: ○(オー) リング  
35: 上側ブロック  
36a: 試料液だめ用開口部  
37: ボルト  
39: 雌ねじ部

実施例のセンサの作製方法の説明に供する図

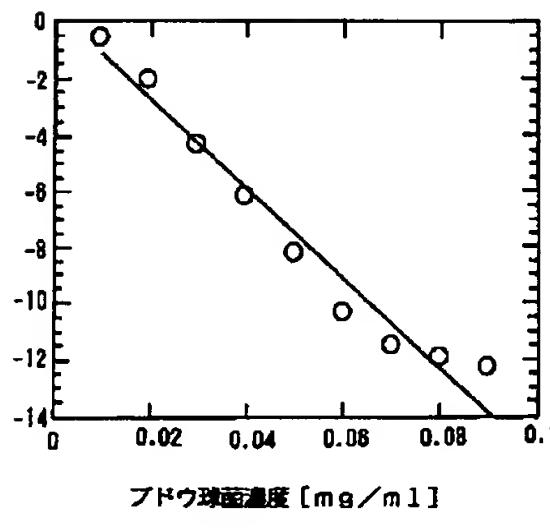
11: STカットの水晶板  
13: 第一のトランジスタ  
15: 第二のトランジスタ  
19: 抗食中毒性細菌抗体  
21: 実施例のセンサ  
23, 25: 増幅器  
17: 表面弹性波発振器  
21: 実施例のセンサ

実施例のセンサ及び測定系の説明に供する図

【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 海部 勝晶  
東京都港区虎ノ門1丁目7番12号 沖電気  
工業株式会社内

(72)発明者 加藤 雅一  
東京都港区虎ノ門1丁目7番12号 沖電気  
工業株式会社内